J. Korean Asso. Radiat. Prot.
Vol. 26 No.2 : 101~111(2001)

■ 論 文 ■

Relationship between the DNA content of human chromosome and their contribution to radiation-induced chromosome aberration analysed by fluorescence *in situ* hybridization(FISH)

Hai Won Chung, Su Young Kim, Sung Whan Ha*, Tae Hwan Kim and Chul Koo Cho****

*School of Public Health, Seoul National University, *College of Medicine, Seoul National University** Korea Cancer Center Hospital*

방사선에 의한 염색체이상과 DNA 함량과의 관계

정해원 · 김수영 · 하성환* · 김태환 · 조철구****

서울대학교 보건대학원, *서울대학교 의과대학, **원자력 병원

(2001년 4월 9일 접수, 2001년 6월 4일 채택)

Abstract - To study the relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural chromosome aberrations, the frequencies of translocations and dicentrics induced in human lymphocytes after *in vitro* exposure to 2Gy of x-ray were analysed by fluorescence *in situ* hybridization(FISH). Single whole chromosome probes(WCP), specific for chromosomes 1, 2, 4, 7, 8, 9, and 21 and triple combination of probes for chromosome 1, 2 & 4 were used separately. A significant deviation of the frequency of symmetrical translocation and dicentrics from a DNA-proportional distribution was observed. Chromosomes 2, 7, 8, 9 and 21 were less frequently involved in the formation of symmetrical translocations and dicentrics than expected, whereas chromosomes 1 and 4 were more frequently involved. Chromosome 2 and 4 showed a higher frequency of acentric fragments. When triple combination probe for chromosome 1, 2 & 4 was used, no differences were found between the observed and expected frequency of exchange type aberrations. The results showed that the frequency of radiation-induced chromosome aberrations was not proportional to DNA contents, suggesting the difference in the susceptibility to specific aberrations among individual chromosomes. The results also indicated that the FISH technique with combination of probes for chromosome 1, 2 & 4 was useful for radiation biodosimetry.

Key words : Fluorescence in situ hybridization(FISH), chromosome aberration, DNA content, chromosome susceptibility, radiation biodosimetry

요약 - 본 연구는 염색체 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 DNA probe를 이용하여 2Gy의 방사선을 조사한 후 DNA 양을 감안한 기대치와 관찰치의 차이를 비교함으로서 각 염색체의 방사선에 대한 감수성을 평가하여 궁극적으로 방사선 피폭시 생물학적 선량계로서 FISH기법의 타당성을 평가하고자 하였다. 1번 및 4번 염색체의 경우 상호전좌와 이동원 염색체의 관찰치가 기대치보다 더 높게 나타났으며 이와 반대로 2, 7, 8 및 9번 염색체의 경우 상호전좌와 이동원염색체의 관찰치 모두 기대치보다 낮게 나타났다. 2번 및 4번 염색체의 경우 1번 염색체보다 더 많은 acentric fragment의 빈도를 나타내었다. 1, 2, 및 4번 염색체 3종을 조합했을 때 상호전좌의 경우 관찰치와 기대치는 세포 100개당 25.5 및 25.40으로 차이가 없었으며 이동원염색체의 경우 13.25 및 13.2로 역시 거의 차이가 없게 나타났다. 따라서 본 연구결과 방사선 피폭시 발생하는 염색체이상 빈도는 염색체마다 DNA 양에 비례해 나타나지 않을 수 있어 각 염색체마다 방사선 감수성에 차이가 있을 것으로 판단된다. 또한 방사선 피폭시 생물학적 선량계로서 1, 2 및 4번을 동시에 관찰 할 경우 염색체 FISH기법을 활용하기 위하여 적절한 염색체 조합이라고 판단된다.

중심어: Fluorescence in situ hybridization(FISH), 염색체이상, DNA content, 염색체 방사선 감수성, 생물학적 선량계

서 론

염색체에 특이한 DNA probe를 이용하는 FISH 기법은 염색체의 구조적 변화를 측정하는 매우 효과적인 방법으로 염색체의 손상을 평가하는 새로운 분자독성학적 방법으로 그 활용성이 증가되고 있다[1-5].

FISH 기법을 이용하여 방사선 피폭의 생물학적 선량계로 이용할 때는 일반적으로 염색체 일부만을 대상으로, 구조적 이상으로 나타나는 염색체의 재배열을 측정하기 때문에 사용한 일부 염색체의 DNA 양을 감안하여 전체 유전체(genome) 상에서 나타나는 염색체 이상을 측정하게 된다. DNA 함량을 기초로 한 Lucas 등(1992)[6]의 공식으로부터 외삽하여 염색체 이상 빈도를 예측할 때 절단점(break point)이 무작위적으로 분포한다는 가정을 필요로 하는데 이러한 가정의 타당성에 대한 비판이 제기되고 있다[1, 5, 7-9].

Knehr 등(1996)은 림프구에 방사선을 조사한 후 12개 염색체(1-4, 6-10, 12, 14번 및 x)를 대상으로 실제 관찰된 염색체이상빈도와 Lucas 공식에 근거한 기대치를 구하여 각 염색체의 감수성(susceptibility)을 비교하였다[7]. 그 결과 관찰치와 기대치간에 차이가 나타났는데 1, 2, 3, 6, 및 7번 염색체에서는 상호전좌 및 이동원염색체 모두 관찰치가 DNA 양을 감안하여 환산한 기대치보다 더 낮게 관찰되었으나 4번 염색체의 경우 관찰치가 기대치보다 더 높게 관찰되었다. 그러나 Boei 등(1997)은 1번 및 4번 염색체의 경우 관찰치가 기대치보다 더 높게 나타났다고 하는[8] 등 특정 염색체마다의 방사선 감수성은 연구자에 따라 각기 다른 결과가 보고되고 있다[10-11]. 따라서 DNA 양에 기초한 Lucas 공식에서 제시한 가정, 즉 절단점은 염색체의 DNA양에 비례해 무작위하게 분포한다는 가정에 대하여 실증적 연구가 수반되어야 할 것이라고 판단된다.

전체 염색체상에 절단점이 DNA양에 비례해 무작위적으로 분포하지 않을 것이라는 이유로서는 염색체의 크기, DNA 손상을 염색체 손상으로 전환하는 것을 조절하는 염색질의 구성(chromatin organization), 각기 다른 agent에 대한 감수성의 차이, 각 염색체 상의 상해의 지속성의 차이, 그리고 염색체의 DNA 회복양상의 차이 등이 나타날 수 있기 때문이다[12]. 그러므로 각 염색체들이 염색체 교환을 형성할 때 참여도가 DNA 양과 비례하지 않기 때문에 이들 염색체의 조합을 잘 선택해야만 전체 유전체 내의 빈도(genomic frequency)를 예측할 수 있을 것이다. 즉 각 염색체마다의 방사선에 대한 감수성의 차이를 감안하여 둘 또는 3개이상의 다중염색체 probe를 이용함으로써 전체 유전체상에서의 염색체이상 빈도의 정확성을 향상시키는 것이 방사선에 대한 생물학적 선량계로서의 타당성이 증대될 수 있을 것이다.

이동원 염색체와 상호전좌는 그 생성기전이 같다고 알려져 있기 때문에 방사선에 의한 이들 염색체이상의 생성빈도도 같을 것으로 기대되지만 실제로는 이들의 생성 빈도에 차이가 나는 것이 보고되고 있다[1, 9, 13]. 많은 연구에서 상호전좌가 이동원염색체보다 더 많이 관찰된다고 보고하고 있는데, Natarajan 등(1994)은 림프구에 방사선을 조사한 후 DNA 회복저해물질인 Ara-C와 3-AB를 처리한 결과 이동원염색체의 빈도는 크게 증가하였으나 상호전좌의 빈도는 차이가 없다는 것을 확인하여 이동원염색체와 상호전좌의 생성기전에 차이가 있을 수 있음을 시사하고 있다[5].

본 연구는 염색체 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 DNA probe를 이용하여 2Gy의 방사선을 조사한 후 기대치와 관찰치의 차이를 비교함으로서 각 염색체의 방사선에 대한 감수성을 평가하여 궁극적으로 방사선 피폭시 생물학적 선량계로서 FISH기법의 타당성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

방사선 조사 및 염색체 표본작성

건강한 사람의 말초혈액을 선형 전자 가속기(LINAC, Vnrian 6/100)로 에너지 6MV photon을 2Gy 조사(dose rate: 2.00Gy/min)하였다. 방사선 조사된 말초혈액 1㎖을 PHA 및 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI배지 9㎖에 넣고 5% CO_2가 공급되는 배양기에서 48시간 배양하였다.

FISH(fluorescence *in situ* hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Orange가 표지된 1, 2, 4 및 21번 각각의 염색체 DNA probe, 1, 2 및 4번 염색체가 섞인 3중 DNA probe(Vysis)와 Spectrum Green이 표지된 7, 8 및 9번 WCP probe(Vysis)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 FISH를 수행하였다.

즉 준비된 슬라이드를 37℃의 2×SSC(sodium chloride, Sodium citrate)용액에 15분씩 2번 방치한 후 Ethanol series(70, 85, 100%)를 수행하여 탈수과정을 거치도록 하였다. 탈수된 슬라이드는

73±1℃에서 5분간 70% formamide/2×SSC 용액에서 변성(denaturation)시킨 후 상온에서 건조하였다. DNA probe 2㎕와 WCP hybridization buffer 7㎕ 및 1㎕의 증류수를 섞어 만든 hybridization mix를 73±1℃에서 5분간 변성시킨 후, 준비된 슬라이드에 점적하여 37℃의 배양기에서 16시간 동안 hybridization 시켰다. 이후 배양기에서 슬라이드를 꺼내 72℃의 0.4×SSC에 5분간 담궈둔 후 꺼내어, 2×SSC/0.5% NP-40에 넣어 2분간 세척하였다. 그 다음 슬라이드를 말리고 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(conterstain)한 후, 관찰할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

현미경 관찰

형광 현미경(NIKON, Biophot)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD(DAPI/FICT/Texase Red, Chroma Technology Corp. 61002)로는 Spectrum Orange, Spectrum Green 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다.

염색체이상 측정방법

본 연구에서는 Tucker 등(1995)에 의해 제안된 명명법인 PAINT(Protocol Aberration Identification and Nomenclature Terminology)system에 근거하여 염색체이상을 분류하는데[14] 특히 교환형 염색체이상인 상호전좌(translocation:t)와 이동원염색체(dicentric chromosome:dic)를 중점적으로 분석하였다.

염색체의 방사선 감수성 분석

염색체이상 빈도는 painting된 특정 염색체에서만 나타나기 때문에 이 염색체가 전체 유전체상에서 차지하는 비율을 계산[6, 15]하여 보정하게 되면 전체 유전체에서의 염색체이상 빈도를 계산할 수 있는데[13, 16], 염색체이상 빈도의 기대치는 Lucas(1992)에 의해 제안된 식에 따라 구하였다[6].

본 연구에서는 염색체의 방사선감수성을 결정하기 위하여 실제 관찰된 염색체이상빈도와 기대치를 비교하였다. 염색체이상 빈도의 기대치는 Lucas (1992)에 의해 제안된 식에 따라 구하였다.

즉 염색체끼리의 상호교환은 이들 염색체의 DNA 양에 따라 나타나며 따라서 FISH기법에 사용된 염색체의 DNA 양이 전체 유전체에서 차지하는 비율은 fp라 한다면 실제 관찰되는 상호전좌가 전체 유전체상에서 차지하는 분율은 2fp(1-fp)가 된다. 한편 Lucas는 남자, 여자 각각 17명을 대상으로 한 연구결과를 기초로 FISH기법에 의해 실제 측정되는 상호전좌의 빈도 Fp를 선량계수(dose-dependent coefficent)인 T(D)와 연관시킨 total genomic frequency(F(G))를 이용하여 구하였다. 이때 F(G)는 F_G=0.976T(D)로 나타나기 때문에 Fp=T(D)·2fp(1-fp)=2.05fp(1-fp)F_G로 전환시킬 수 있다.

즉 $F_G=\frac{F_P}{2.05f_P(1-f_p)}$로 나타낼 수 있다.

이는 $F_G=\frac{n}{2.05\sum N_i f_i(1-f_i)}$ (1)

이때 n= 실제 관찰된 모든 염색체에서의 교환형염색체이상 빈도

N_i= i번째 염색체를 관찰하기 위해 분석된 세포의 수

f_i= i번째 염색체내의 DNA 양

으로 표시된다.

또한 각 염색체당 기대되는 교환형염색체이상 빈도(Y_i)는

Y_i=2.05fp(1-fp)F_G (2)

로 나타낼 수 있다.

즉 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체 각각 또는 1, 2, 4번 조합 염색체의 함량을 고려하여 F(G)값을 구해 교환형 염색체이상의 기대치 Y_i를 구한 후 실제 관찰치와 비교한다.

또한 실제 관찰된 염색체이상빈도와 기대치간 에 차이의 유무를 비교하기 위하여 DNA 양을 고려하여 χ^2 test를 실행하였다.

즉 1번 염색체 DNA 양 8.15%, 2번 7.94%, 4번 6.29%, 7번 5.27%, 8번 4.77%, 9번 4.46% 및 21번 1.54% 모두 합친 값을 1로 보고 관찰된 모든 교환형 염색체이상을 합한 수에서 각 염색체가 차지하는 DNA 양과 비례하여 염색체이상의 기대치를 구한 후 이를 관찰치와 비교하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\chi^2=\sum\frac{(N_iY_i-N_i\hat{Y}_i)^2}{N_i\hat{Y}_i} \quad (3)$$

이때 N_i= i번째 염색체를 관찰하기 위해 분석된 세포의 수

Y_i= i번째 염색체내의 DNA 양

으로 표시된다.

결 과

표 1은 2Gy 방사선 조사에 의한 각종 염색체이상 빈도를 PAINT system에 의해 분류한 결과를 보여주고 있다. 상호전좌 중 4번 염색체에서는 t(Ab)가 t(Ba)보다 많이 나타났으나 2, 8, 9번 염색체의 경우 t(Ba)가 더 많이 나타났다. 이동원염색체는 dic(BA)가 dic(BB)에 비해 모든 염색체에서 전반적으로 높게 나타났다.

표 2는 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체 각각과 1, 2, 및 4번 염색체 3종을 조합했을 때 관찰되는 염색체이상 중 상호전좌와 이동원 염색체의 빈도는 각 형태별로 분류한 결과이다. 이때 상호전좌와 이동원염색체 빈도간의 비는 1, 2, 4, 7, 8, 및 21번 염색체 각각 1.68, 1.96, 2.13, 2, 1.4, 5로 상호전좌의 빈도가 이동원염색체의 빈도보다 적게는 1.68배, 많게는 5배까지 더 많이 관찰되었으나 9번 염색체의 경우 오히려 상호전좌보다 이동원염색체의 빈도가 1.2배 더 많이 관찰되었다. 또한 acentric fragment의 경우 1, 2 및 4번 염색체 각각에서 세포 100개 당 1.76, 4.48 및 4.99개를 나타내어 DNA 양을 감안한다고 하더라도 2번 및 4번 염색체의 경우 1번 염색체보다 더 많은 acentric fragment의 빈도를 나타내었다.

표 3, 그림 1 및 2는 Lucas 공식에 의해 산출된 F_G를 환산해서 얻은 기대치와 관찰치를 비교한 결과이다.

1, 2, 4, 7, 8, 9, 및 21번 염색체가 전체 유전체 상에 차지하는 DNA 양은 38.38%로 상호전좌의 경우 F_G=64.7%, 이동원염색체의 경우 F_G= 36.37%로 산출되었다. 1번 및 4번 염색체의 경우 상호전좌와 이동원 염색체의 관찰치가 기대치보다 더 높게 나타났으며 이와 반대로 7, 8 및 9번 염색체의 경우 상호전좌와 이동원염색체의 관찰치 모두 기대치보다 낮게 나타났다. 1, 2, 및 4번 염색체 3종을 조합했을 때 전체 유전체 상에 차지하는 DNA 양은 22.34%로 상호전좌의 경우 F_G= 71.7%, 이동원염색체의 경우 F_G=37.37%로 산출되었다. 상호전좌의 경우 관찰치와 기대치는 세포 100개당 25.5 및 25.40으로 차이가 없었으며 이동원염색체의 경우 13.25 및 13.2로 역시 거의 차이가 없게 나타났다.

표 4에서 보는 바와 같이 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체간에 일어나는 교환형 염색체이상의 확률을 이들 전체 DNA 양 38.38%를 1로 보고 각 염색체의 DNA 양을 비례적으로 환산하여 구한 기대치와 관찰치를 비교한 결과 역시 표 3에서 보이는 결과와 같이 1번 및 4번 염색체의 경우 상호전좌 및 이동원염색체 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 높게 나타났으며 2, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 경우 상호전좌 및 이동원염색체 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 더 낮게 나타났다(상호전좌: χ^2=65.65, df=6, $p<0.001$, 이동원염색체: χ^2=25.07, df=6, $p<0.001$).

Table 1. Frequencies of translocations, insertions, dicentrics and acentric fragments induced by 2Gy radiation exposure

Chromosome	No. of Cells Scored	No. of translocations		No. of dicentrics		No. of acentric fragments		No. of insertions
		t(Ab)	t(Ba)	dic(BA)	dic(BB)	ace(b)	ace(ba)	ins(abA)
1	512	59	52	32	15	6	3	7
2	491	25	46	19	6	3	19	2
4	481	58	27	15	17	29	19	19
1+2+4	498	85	89	61	5	33	5	28
7	450	7	8	3	4	3	1	0
8	350	8	14	9	1	4	0	0
9	713	5	9	10	2	2	0	0
21	413	3	2	0	1	1	0	9

Table2. Classification of radiation-induced aberrations in chromosomes 1, 2, 4, 7, 8, 9 and 21

Chromosome	1	2	4	1+2+4	7	8	9	21
DNA contents	8.15(%)	7.90(%)	6.29(%)	22.34(%)	5.27(%)	4.77(%)	4.46(%)	1.54(%)
Cells scored	512	491	481	498	450	350	713	413
Σ translocation(t)	79	49	68	127	14	14	10	5
t_c	32	22	17	47	1	6	4	0
t_i t(Ab)	27	3	41	38	6	2	1	3
t_i t(Ba)	20	24	10	42	7	6	5	2
Σ dicentric(dic)	47	25	32	66	7	10	12	1
dic(BA)	32	19	15	61	3	9	10	1
dic(BB)	15	6	17	5	4	1	2	0
Σ ace	9	22	24	38	4	3	2	1
ace(b)	6	19	14	33	3	3	2	1
ace(ba)	3	3	10	5	1	0	0	0
Σ t / Σ dic	1.68	1.96	2.13	1.92	2	1.4	0.83	5

t_c : complete translocation involving both t(Ab) and t(Ba) in one cell.

t_i : incomplete translocation.

Table 3. Observed and expected frequencies of radiation-induced chromosome aberrations

Chromosome	% DNA contents	Cells scored	Translocations		dicentrics	
			Observed (per 100 cells)	Expected[a] (per 100 cells)	Observed (per 100 cells)	Expected[b] (per 100 cells)
1	8.15	512	15.43	9.94	9.18	5.57
2	7.90	491	9.98	9.66	5.10	5.42
4	6.29	481	14.10	7.82	6.65	4.83
1+2+4	22.34	498	25.50	25.40	13.25	13.2
7	5.27	450	3.1	7.05	1.56	3.95
8	4.77	350	4.0	6.02	2.86	3.38
9	4.46	713	2.0	5.84	1.54	3.27
21	1.54	413	1.2	1.92	0.24	1.12

a: expected value calculated by Lucas's formula(for 1, 2, 4, 7, 8, 9, and 21 F_G=64.7% and for 1+2+4, F_G=71.7%).

b: expected value calculated by Lucas's formula(for 1, 2, 4, 7, 8, 9, and 21, F_G=36.3% and for 1+2+4, F_G=37.3%).

Table 4. Nonrandomness of radiation-induced chromosome aberrations among painted chromosomes

		Aberrant chromosome							Total
		1	2	4	7	8	9	21	
translocation (per 500 cells)	Observed	77.15	49.9	70.5	15.56	20	7.01	6.053	246.17
	Expected*	52.29	50.66	40.35	33.80	30.60	28.60	9.87	246.17
	Deviation from expected	+24.86	-0.76	+30.15	-18.24	-10.6	-21.59	-3.817	0
	d^2/E	11.82	0.011	22.53	9.84	3.67	16.30	1.478	65.649
Chi-square & P-value		χ^2=65.649						p<0.001	
dicentrics (per 500 cells)	Observed	45.9	25.5	33.25	7.78	14.29	8.42	1.21	136.35
	Expected*	28.96	28.06	22.35	18.72	16.95	15.84	5.47	136.35
	Deviation from expected	+16.94	-2.56	+10.9	-10.94	-2.66	-7.42	-4.26	0
	d^2/E	9.91	0.23	5.32	6.39	0.42	3.48	3.32	29.07
Chi-square & P-value		χ^2=29.07						p<0.001	

*Expected numbers of aberrations are calculated on the basis of the DNA content of the chromosomes. 1: 8.15%, 21.24%, 2: 7.90%, 20.58%, 4: 6.29%, 16.39%, 7: 5.27%, 13.73%, 8: 4.77%, 12.43%, 9: 4.46%, 11.62%, 21: 1.54%, 4.01%.

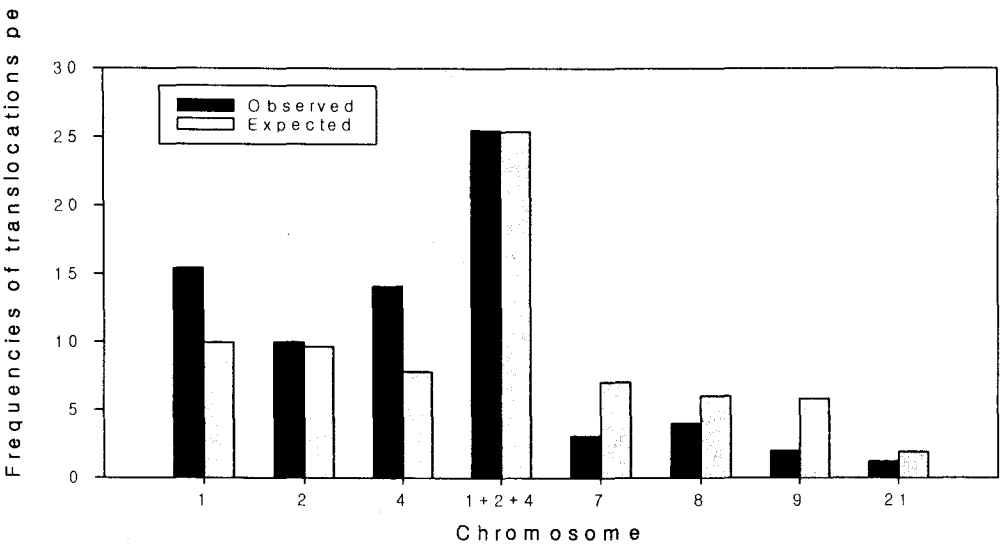

Fig. 1. Observed and expected frequencies of radiation-induced translocations in each chromosome. Expected values were calculated according to Lucas's formula(1992).

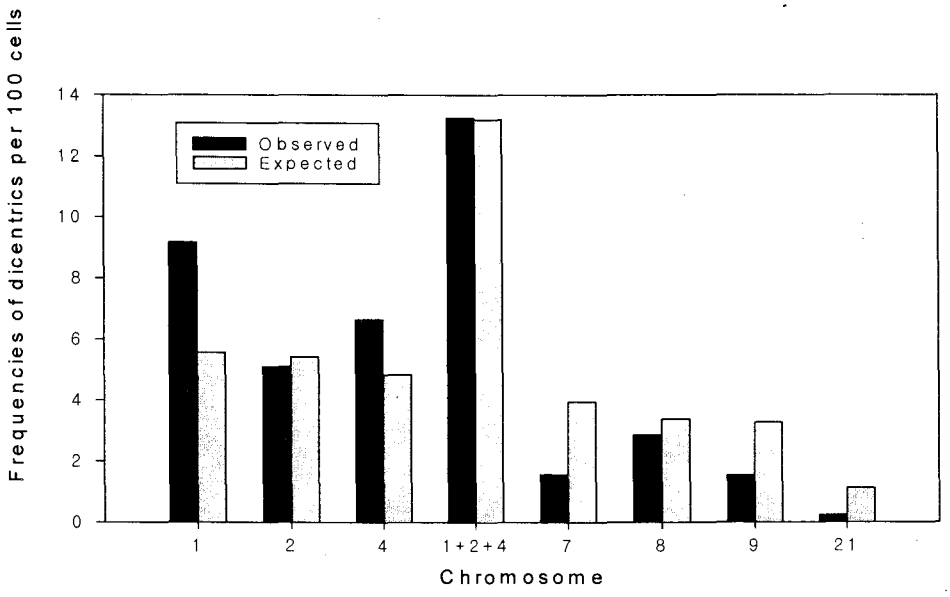

Fig. 2. Observed and expected frequencies of radiation-induced dicentrics in each chromosome. Expected values were calculated according to Lucas's formula(1992).

고 찰

현재까지 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)기법은 특정염색체 혹은 몇 개의 염색체를 조합하여 수행되는 것이 일반적이다. 특정 염색체 상에서 발생한 염색체이상빈도를 전체염색체이상 빈도로 외삽시키기 위해서는 DNA 양을 감안한 Lucas 등(1992)의 공식을 적용시키게 되는데[6], 이때 물리적·화학적 요인에 의한 손상부위가 전체 염색체상에 무작위로 분포되어야 한다는 가정이 전제되어야 한다. 그러나 이러한 가정에 대한 비판이 제기되고 있으며 각 염색체마다 방사선감수성이 존재할 것이라는 가설을 제시할 수 있다[7, 10-11, 17].

본 연구는 사람 림프구를 *in vitro*에서 2Gy의 방사선에 조사한 후 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체 각각의 염색체이상 빈도의 관찰치와 Lucas 등(1992)에 의해 제안된 식에 따라 기대치를 구하여 염색체의 방사선감수성을 비교하였다. 그 결과 1번 및 4번 염색체의 경우 방사선 피폭시 상호전좌 및 이동원염색체이상 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 높게 나타났다. 반면에 2, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 경우 상호전좌 및 이동원염색체 이상 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 낮게 나타나 1번 및 4번 염색체가 다른 염색체에 비해 방사선 감수성이 상대적으로 높게 나타났다. 또한 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체간에 일어나는 교환형 염색체이상의 확률을 이들 염색체들의 DNA 양이 전체에서 차지하는 비율인 38.38%를 1로 보고 각 염색체의 DNA 양을 비례적으로 환산하여 구한 기대치와 관찰치를 비교한 결과 역시 1번 및 4번 염색체의 경우 상호전좌 및 이동원염색체 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 높게 나타났으며 2, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 경우 상호전좌 및 이동원염색체 빈도 모두 관찰치가 기대치보다 더 낮게 나타났다. 염색체의 방사선 감수성은 연구자마다 차이를 보이고 있는데 Natarajan 등(1992)은 x선 및 중성자에 의한 상호전좌 빈도가 1번 염색체의 경우 기대치보다 관찰치가 더 많이 나타났다고 보고하고 있으며[1], Boei 등(1997)도 x선에 의한 상호전좌 및 이동원염색체 빈도가 1번 및 4번 염색체의 경우 기대치보다 관찰치가 더 많이 관찰되었다고 보고하고 있어[8] 본 연구와 일치하는 양상을 보이고 있다. Johnson 등(1999)은 상염색체 중 14개(1, 4-8, 10-13, 17-20번) 염색체는 DNA 양에 비례하여 절단점(break point)이 분포하지만 나머지 8개의 상염색체 및 성염색체에서는 기대치와 차이가 난다고 보고하였다[12]. 반면에 Knehr 등(1996)은 실제 염색체이상 빈도와 기대치간에 차이가 발생하였으며 1, 2, 3, 6, 및 7번 염색체에서는 상호전좌 및 이동원염색체 모두 관찰치가 기대치보다 더 낮게 관찰되었으나 4번 염색체의 경우 관찰치가 기대치보다 더 높게 관찰되었다고 보고하였다[7]. 연구자마다 다른 결과를 보고하는 이유로서는 연구에 이용된 염색체의 수가 상이하기 때문일 가능성을 배제할 수 없다. 12개의 염색체를 대상으로 한 Knehr 등(1996)의 연구에서는 상호전좌의 경우 F_G=0.81, 이동원염색체의 경우 F_G=0.59로 나타났으며[7], 선행 연구에서 얻은 결과를 조합하여 전체 염색체(1-22, x)를 대상으로 한 Barquinero 등(1998) 의 연구에서는 상호전좌 중 t(Ab)와 t(Ba)의 경우 각각 F_G=0.72, F_G=0.79로 나타났으며 이동원염색체의 경우 F_G=0.77로 나타났다[18]. 본 연구에서는 상호전좌의 경우 F_G=0.65, 이동원염색체의 경우 F_G=0.36로 차이가 나는 것을 알 수 있다. 즉 보다 많은 염색체 수를 분석 대상으로 하게 되면 보다 정확한 F_G값을 산출할 수 있지만, 각 연구자마다 3쌍에서 12쌍의 한정된 수의 염색체만을 대상으로 하였으며, 본 연구에서는 7쌍만을 대상으로 하였기 때문에 결과가 차이가 날 수도 있다. 그러나 현재까지 연구자마다 공통적인 결과는 4번 염색체가 방사선에 상대적으로 민감하다고 보고하고 있어 본 연구결과와 일치하는 양상을 보이고 있으나[7-8, 12, 17], 1, 2, 7, 8, 9 및 21번 염색체의 방사선 감수성은 연구마다 차이를 보이고 있다[10-12].

각 염색체마다 이와 같이 방사선 피폭시 염색체 이상빈도의 기대치와 관찰치간에 차이가 나타나는 이유로서 다음과 같은 요인들을 제시할 수 있는데 첫 번째로는 염색체의 크기, 두 번째로는 DNA 손상을 염색체 손상으로 전환하는 것을 조절하는 염색질의 구성(chromatin organization), 세 번째로는 각기 다른 agent에 대한 감수성의 차이, 네 번째로는 각 염색체 상의 상해의 지속성의 차이, 다섯 번째로는 염색체의 DNA 회복양상의 차이 등을 들 수 있다[12].

1번 염색체의 경우 p arm 말단부위(1p3.6)에 많은 절단부위가 존재하여[19] 이들 부위가 방사선 피폭시 민감한 손상부위로 작용할 것으로 추측할 수 있다. 뿐만 아니라, 비활성 DNA로 이루어져 있는 heterochromatin 부위가 동원체 주변(1q1.2)에 군집되어 있어 이들 부위에 손상부위가 많이 모여있다고 알려져 있는 데[12], 이러한 비활성 DNA로 이루어져 있는 heterochromatin 부위는 활성 DNA

부위보다 DNA 손상회복이 잘 일어나지 않기 때문에 방사선 피폭시 손상 정도가 염색체이상으로 나타난다고 할 수 있다. 4번 염색체의 경우 CpG island가 부족하여 이 부분에 분포하는 염색체 손상부위를 회복시키는 데 관여하는 전사 유전자가 상대적으로 낮게 분포하기 때문에 방사선 감수성이 높을 것이라고 설명할 수 있으나[20] 아직까지 확실하지 않아 이에 대한 연구가 좀더 수행되어야 할 것이다.

일반적으로는 대부분의 염색체의 경우 방사선 조사에 의해 상호전좌의 빈도가 이동원염색체의 빈도보다 높게 나타났으며[1, 9, 13], 본 연구에서도 상호전좌와 이동원염색체 빈도간의 비는 1, 2, 4, 7, 8, 및 21번 염색체 각각 1.68, 1.96, 2.13, 2, 1.4 및 5로 상호전좌의 빈도가 이동원염색체의 빈도보다 적게는 1.68배, 많게는 5배까지 더 많이 관찰되었다. 그러나 9번 염색체의 경우 이동원염색체가 상호전좌보다 1.2배 더 많이 관찰되었다. 9번 염색체를 대상으로 이동원염색체와 상호전좌의 빈도를 분석한 타 연구 결과를 찾아볼 수 있지만 9번 염색체가 이동원염색체 형성에 더 많이 관여한다는 보고들[7, 17, 21]도 있어 본 연구결과를 뒷받침해준다. 또한 acentric fragment의 경우 1, 2, 4, 7, 8, 9 및 21번 염색체 각각에서 세포 100개당 1.76, 4.48, 4.99, 0.88, 0.86, 0.28 및 0.24개를 나타내어 DNA 양을 감안한다고 하더라도 2번 및 4번 염색체의 경우 1, 7, 8, 9 및 21번 염색체보다 더 많은 acentric fragment의 빈도를 나타내어 1번 및 2번 염색체를 대상으로 염색체이상을 조사한 Wojcik와 Streffer(1998)의 연구결과와 일치한다[11]. Natarajan 등(1994)의 방사선 피폭시 염색체이상 빈도를 조사한 연구에서는 DNA 회복저해물질 Ara-C와 3-AB을 처리했을 때 이동원염색체의 빈도는 증가하였으나 상호전좌의 빈도는 일정한 비율을 유지하고 있어 이동원염색체와 상호전좌의 생성기전에 차이가 있을 수 있음을 시사하고 있다[5].

이와 같은 결과를 통해 이동원염색체 및 acentric fragment는 특정 염색체에 특이적으로 더 많이 생성된 것을 관찰하였지만 이를 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

1, 2, 및 4번 염색체의 3중 DNA probe를 이용하여 방사선 피폭시 염색체이상 빈도의 관찰치와 기대치를 조사한 결과 상호전좌 및 이동원염색체 모두 유의한 차이를 보이지 않고 있다. Gebhart 등(1996)은 염색체 1, 2 및 4번 염색체를 동시에 관찰한 결과 방사선 피폭시 관찰치와 기대치간에 차이가 없다고 보고하고 있어[22] 본 연구결과와 일치하는 양상을 보이고 있다. 방사선 피폭시 생물학적 선량계로서 1, 2 및 4번을 동시에 관찰 할 경우 염색체 FISH기법을 활용하기 위하여 적절한 염색체 조합이라고 판단된다.

따라서 본 연구결과 방사선에 의한 염색체이상 빈도의 관찰치와 기대치간에 차이가 있어 각 염색체들이 염색체 교환을 형성할 때 참여도가 DNA 양과 비례하지 않을 수도 있기 때문에 이들 염색체의 조합을 잘 선택해야만 방사선 피폭시 발생하게 되는 염색체이상 빈도의 정확성을 향상시킬 수 있을 것이며, 궁극적으로 FISH기법의 방사선에 대한 생물학적 선량계로서의 타당성을 검증할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구결과 방사선 피폭시 1번 및 4번 염색체가 다른 염색체에 비해 염색체이상 빈도의 관찰치가 기대치보다 더 많이 나타났으며, 이동원 염색체 및 acentric fragment의 빈도가 특정 염색체에서 증가하는 양상을 나타내어 이 부분에 대한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. A.T. Natarajan, R.C. Vyas, F. Darroudi and S. Vermeuler, "Frequencies of X-ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocyte as detected *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries", *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 199-203(1992).
2. M. Bauchinger, E. Schmid, H. Zitselsberger, H. Braselmann and U. Nahrestedt, "Radiation -induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome -specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe", *Int. J. Radiat. Biol.*, 64, 179 -184(1993).
3. M. Nakano, E., Nakashima, D.J. Pawell, Y. Kodama, and A. Awa, "Frequency of reciprocal translocation and dicentrics induced in human blood lymphocyte by X-irradiation

as determined by fluorescence *in situ* hybridization", *Int. J. Radiat. Biol.*, 64(5), 565-569(1993).

4. E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray and M. Bauchinger, "Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes", *Int. J. Radiat. Biol,* 62(6), 673-678(1992).
5. A.T. Natarajan, A.S. Balajee, J.J.W.A. Boei, S. Chatterjee, F. Darroudi, M. Grigorova, M. Noditi, H.J. Oh, P. Slijepcevic and S. vermeulen, "Recent developments in the assessment of chromosomal damage", *Int. J. Radiat. Biol*, 66(5), 615-623(1994).
6. J.N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H.-U. Weier, D. Pinkel, J. Gray and G. Littlefield, "Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation", *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(1), 53-63(1992).
7. S. Knehr, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, U. Nahrstedt and M. Bauchinger, "Chromosome analysis by fluorescence *in situ* hybridization: further indications for a non DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations", *Int J Radiat Biol*, 70(4), 385-92(1996).
8. J.J.W.A. Boei, S. Vermeulen and A.T. Natarajan, "Differential involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after x-irradiation", *Int. J. Radiat. Biol.*, 72(2), 139-145(1997).
9. H.W. Chung, S.Y. Kim and S.W. Ha, "analysis of chromosome aberrations by fluorescence *in situ* hybridization using triple chromosome-specific probes in human lymphocyte exposed to radiation", *J. Korean Asso. Radiat. Prot*, 24(1), 45-53(1999).
10. P. Finnon, D.C. Lloyd and A.A. Edwards, "Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry", *Int. J. Radiat. Biol.*, 68(4), 429-435(1995).
11. A. Wojcik and C. Streffer, "Comparison of radiation-induced aberration frequencies in chromosomes 1 and 2 of two human donors", *Int. J. Radiat. Biol.*, 74(5), 573-581(1998).
12. K.L. Johnson, D.J. Brenner, J. Nath, J.D. Tucker, and C.R. Greard, "Review Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random?", *Int. J. Radiat. Biol*, 75(2), 131-141(1999).
13. J.D Tucker, M.J. Ramsey, D.A. Lee and J.L. Hinkler, "Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*", *Int. J. Radiat. Biol.*, 64, 27-37(1993).
14. J.D. Tucker, K.A. Lee and K.H. Moore, "Validation of chromosome painting. II : A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*", *Int. J. Radiat. Biol.*, 67(1), 19-28(1995).
15. M.L. Mendelsohn, B.H. Mayall, E. Bogara, D.H. Moore II and B.H. Perry, "DNA content and DNA based centromere index of the 24 human chromosome", *Science,* 179, 1126-1129(1973).
16. J.N. Lucas, T. Tenjin, T. Straume, K. Pinkel, D. Moor, M. Litt and J.W. Gray, "Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization", *Int. J. Radiat. Biol.*, 56, 35-44(1989).
17. S. Knehr, H. Zitzelsberger, H. Braselmann and M. Bauchinger, "Analysis for DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization", *Int J Radiat Biol.*, 65(6), 683-90(1994).
18. J.F. Barquinero, S. Knehr, H. Braselmann, M. Figel and M. Bauchinger, "DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype", *Int J Radiat Biol.*, 74(3), 315-

23(1998).
19. L. Barrios, R. Miró, M. R. Caballín, C. Fuster, F. Guedea, A. Subias and J. Egozcue, "Cytogenetic effects of radiotherapy: breakpoint distribution in induced chromosome aberrations", *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 41, 61-70(1989).
20. J.M. Craig and W.A. Bickmore, "The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes", *Nature Genet.*, 7, 376-381(1994).
21. B. Dutrillaux, J. Couturier, E. Viegas-Pequignot and G. Schaison, "Localization of chromatid breaks in Fanconi's Anemia, using three consecutive stains", *Human Genetics*, 37, 65-71(1977).
22. E. Gebhart, S. Neubauer, G. Schmitt, S. Birkenhake and J. Dunst, "Use of a three color chromosome *in situ* suppression technique for the detection of past radiation exposure", *Radiation Research*, 145, 47-52(1996).